

I • Cultura laboratorial dos microrganismos

Para se cultivar microrganismos em laboratório é necessário supri-los com todos os nutrientes que eles requerem. A exigência de nutrientes varia muito, e um conhecimento acerca dos princípios da nutrição microbiana é necessário para o sucesso de uma cultura de microrganismos. Serão analisados alguns princípios gerais da nutrição microbiana e, em seguida, esses princípios serão expandidos no Capítulo 13, no qual a ampla diversidade metabólica do mundo microbiano será evidenciada.

3.1 Química e nutrição celular

Organismos diferentes necessitam de complementos nutricionais distintos, e nem todos os nutrientes são exigidos na mesma quantidade. Alguns nutrientes, denominados *macronutrientes*, são necessários em grandes quantidades, enquanto outros, denominados *micronutrientes*, são necessários apenas em quantidades traço.

Composição química de uma célula

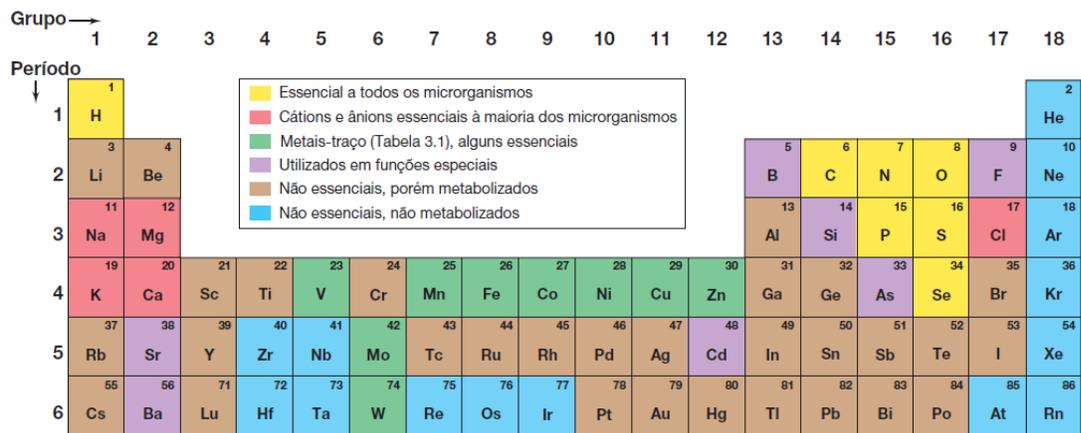
Todos os nutrientes microbianos são originados dos elementos químicos. Contudo, somente alguns poucos elementos dominam os sistemas vivos e são essenciais: hidrogênio (H), oxigênio (O), carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S) e selênio (Se). Adicionalmente a estes, pelo menos 50 outros elementos químicos, embora não sejam requisitados, são metabolizados de alguma forma pelos microrganismos (Figura 3.1).

Além da água, que corresponde a 70 a 80% do peso seco de uma célula microbiana (uma única célula de *Escherichia coli* pesa apenas 10^{-12} g), as células consistem principalmente de macromoléculas – proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e polissacarídeos; os blocos de construção (monômeros) dessas macromoléculas são os aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos e açúcares, respectivamente. As proteínas dominam a composição molecular de uma célula, correspondendo a 55% do peso seco total celular. Além disso, a diversidade de proteínas excede aquela de todas as macromoléculas combinadas. Interessantemente, embora o DNA seja tão importante para uma célula, esse contribui com uma pequena porcentagem do peso seco celular; o RNA é muito mais abundante (Figura 3.1c).

Os dados demonstrados na Figura 3.1 são de análises atuais de células de *E. coli*; dados comparáveis variam um pouco de um microrganismo para outro. Contudo, em qualquer célula microbiana, carbono e nitrogênio são macronutrientes importantes, por isso, inicia-se o estudo sobre nutrição microbiana com esses elementos essenciais.

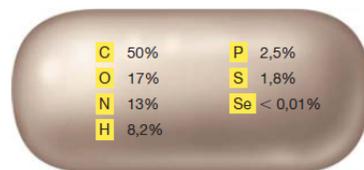
Carbono, nitrogênio e outros macronutrientes

Todas as células requerem carbono, e a maioria dos procaríotes necessita de compostos *orgânicos* (que contêm carbono) como sua fonte de carbono. Cerca de 50% do peso seco de uma célula bacteriana é composto por carbono (Figura 3.1b). O carbono é



(a)

Elementos essenciais como uma porcentagem do peso seco da célula



(b)

Composição macromolecular de uma célula

| Macromolécula | Porcentagem do peso seco |
|--------------------|--------------------------|
| Proteína | 55 |
| Lipídeo | 9,1 |
| Polissacarídeo | 5,0 |
| Lipopolissacarídeo | 3,4 |
| DNA | 3,1 |
| RNA | 20,5 |

(c)

Figura 3.1 Composição elementar e macromolecular de uma célula bacteriana. (a) Tabela periódica microbiana dos elementos. Com exceção do urânio, que pode ser metabolizado por alguns procaríotes, os elementos do período 7 ou além, na tabela periódica completa dos elementos, não são meta-

bolizados. (b) Contribuição dos elementos essenciais para o peso seco da célula. (c) Abundância relativa das macromoléculas em uma célula bacteriana. Dados em (b) de *Aquat. Microb. Ecol.* 10: 15–27 (1996) e em (c) de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. ASM, Washington, DC (1996).

obtido de aminoácidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, açúcares, bases nitrogenadas, compostos aromáticos e outros inúmeros compostos orgânicos. Alguns microrganismos são autótrofos, sendo capazes de sintetizar as suas próprias estruturas celulares a partir do dióxido de carbono (CO₂).

Uma célula bacteriana é composta por cerca de 13% de nitrogênio, presente em proteínas, ácidos nucleicos e vários outros compostos celulares. O volume de nitrogênio disponível é encontrado na natureza na forma de amônia (NH₃), nitrato (NO₃⁻) ou em gás nitrogênio (N₂). Praticamente todos os procariotos são capazes de utilizar o NH₃ como sua fonte de nitrogênio, embora outros possam também utilizar o NO₃⁻, e alguns conseguem ainda utilizar fontes orgânicas de nitrogênio, como os aminoácidos. O N₂ só consegue ser utilizado como uma fonte de nitrogênio por procariotos fixadores de nitrogênio (Seção 3.17).

Seguindo C, N e O e H (da água, H₂O), muitos outros macronutrientes são necessários às células, mas geralmente em quantidades menores (Figura 3.1b). O fósforo é requerido pela célula para a síntese de ácidos nucleicos e fosfolípidos, e geralmente é fornecido à célula na forma de fosfato (PO₄²⁻). O enxofre está presente nos aminoácidos cisteína e metionina e também em uma série de vitaminas, como tiamina, biotina, ácido lipoico, e geralmente é fornecido à célula na forma de sulfato (SO₄²⁻). O potássio (K) é necessário para a atividade de diversas enzimas, enquanto o magnésio (Mg) é necessário para a estabilização dos ribossomos, membranas e ácidos nucleicos, sendo também necessário à atividade de muitas enzimas. O cálcio (Ca) e o sódio

(Na) são nutrientes essenciais para apenas alguns organismos, o sódio em particular para os microrganismos marinhos.

Micronutrientes: metais-traço e fatores de crescimento

Os microrganismos requerem vários metais para o crescimento, geralmente em pequenas quantidades, e esses fazem parte dos *micronutrientes* que são necessários (Figura 3.1a). Entre esses, o principal é o ferro, que desempenha um importante papel na respiração celular. O ferro é um componente essencial de citocromos e das proteínas que contêm ferro e enxofre envolvidas nas reações de transporte de elétrons (Seção 3.10). Além do ferro, vários outros metais são necessários ou metabolizados pelos microrganismos (Figura 3.1a). Coletivamente, esses micronutrientes são denominados *elementos-traço* ou *metais-traço*. Os elementos-traço, normalmente, desempenham o papel de cofatores para enzimas. A Tabela 3.1 lista os principais elementos-traço e exemplos de enzimas em que cada um desempenha um papel.

Fatores de crescimento são micronutrientes orgânicos (Tabela 3.1). Os fatores de crescimento comuns incluem as vitaminas, porém aminoácidos, purinas, pirimidinas ou diversas outras moléculas orgânicas podem ser fatores de crescimento para um ou outro organismo. As vitaminas correspondem ao fator de crescimento mais comumente requerido, sendo alguns outros igualmente comuns listados na Tabela 3.1. A maioria das vitaminas atua como coenzimas, que são componentes não proteicos das enzimas (Seção 3.5). As necessida-

Tabela 3.1 Micronutrientes requeridos pelos microrganismos^a

| I. Elementos-traço | | II. Fatores de crescimento | |
|-------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Elemento | Função | Fator de crescimento | Função |
| Boro (B) | Autoindutor de <i>quorum sensing</i> (comunicação célula-célula) em bactérias; também encontrado em alguns antibióticos policetídeos | PABA (ácido <i>p</i> -aminobenzoico) | Precursor do ácido fólico |
| Cobalto (Co) | Vitamina B ₁₂ ; transcaboxilase (apenas em bactérias do ácido propiónico) | Ácido fólico | Metabolismo de um carbono; transferência de grupos metil |
| Cobre (Cu) | Na respiração, citocromo <i>c</i> oxidase; na fotossíntese, plastocianina, presente em alguns superóxido dismutases | Biotina | Biossíntese de ácidos graxos; algumas reações de fixação de CO ₂ |
| Ferro (Fe) ^b | Citocromos; catalases; peroxidases; proteínas de ferro e enxofre; oxigenases; todas as nitrogenases | B ₁₂ (Cobalamina) | Metabolismo de um carbono; síntese de desoxirribose |
| Manganês (Mn) | Ativador de muitas enzimas; componente de algumas superóxido dismutases e da enzima que quebra a molécula de água em fototrófos oxigênicos (fotossistema II) | B ₁ (Tiamina) | Reações de descarboxilação |
| Molibdênio (Mo) | Certas enzimas contendo flavina; algumas nitrogenases, nitrato redutases, sulfito oxidases, DMSO-TMAO redutases; algumas formato-desidrogenases | B ₆ (Piridoxal) | Transformações de aminoácidos e cetoácidos |
| Níquel (Ni) | Maioria das hidrogenases; coenzima F ₄₃₀ dos metanógenos; monóxido de carbono desidrogenase; urease | Ácido nicotínico (Niacina) | Precursor de NAD ⁺ |
| Selênio (Se) | Formato desidrogenases; algumas hidrogenases; o aminoácido selenocisteína | Riboflavina | Precursor de FMN, FAD |
| Tungstênio (W) | Algumas formato-desidrogenases; oxotransferases dos hipertermófilos | Ácido pantotênico | Precursor da coenzima A |
| Vanádio (V) | Vanádio nitrogenase; bromoperoxidase | Ácido lipoico | Descarboxilação de piruvato e α-cetoglutarato |
| Zinco (Zn) | Anidrase carbônica; polimerases de ácido nucleico; muitas proteínas de ligação ao DNA | Vitamina K | Transporte de elétrons |

^aNem todos os elementos-traço ou fatores de crescimento são requeridos por todos os organismos.

^bO ferro é normalmente requerido em quantidades maiores do que os outros metais-traço apresentados.

des vitamínicas diferem entre os microrganismos, variando de nenhuma a muitas. As bactérias lácticas, que incluem os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (☞ Seção 15.6), são conhecidas por suas várias necessidades vitamínicas, as quais superam inclusive as necessidades dos seres humanos (ver Tabela 3.2).

MINIQUESTIONÁRIO

- Quais os quatro elementos químicos que constituem a maior parte do peso seco de uma célula?
- Quais as duas classes de macromoléculas que contêm a maior quantidade de nitrogênio em uma célula?
- Diferencie “elementos-traço” e “fatores de crescimento”.

3.2 Meios e cultura de laboratório

Um **meio de cultura** é uma solução nutritiva utilizada para promover o crescimento de microrganismos. Pelo fato de a cultura em laboratório ser requerida para o estudo detalhado de qualquer microrganismo, é necessária atenção criteriosa na seleção e no preparo dos meios para que o cultivo seja bem-sucedido.

Classes de meios de cultura

Dois grandes classes de meios de cultura são utilizadas em microbiologia: meios definidos e meios complexos. Os **meios definidos** são preparados pela adição de quantidades precisas de compostos químicos inorgânicos ou orgânicos à água destilada. Portanto, a *composição química exata* de um meio definido (de forma qualitativa e quantitativa) é conhecida. A fonte de carbono é de importância fundamental em qualquer meio de cultura, uma vez que todas as células necessitam de grandes quantidades de carbono a fim de sintetizarem novo material

celular (Figura 3.1). A natureza da fonte de carbono e sua concentração dependem do organismo a ser cultivado. A **Tabela 3.2** lista fórmulas para quatro meios de cultura. Alguns meios definidos, como aquele listado para *Escherichia coli*, são considerados “simples”, uma vez que apresentam apenas uma única fonte de carbono. Nesse meio, as células de *E.coli* produzem todas as moléculas orgânicas a partir da glicose.

Para o cultivo de muitos microrganismos, o conhecimento da composição exata de um meio não é essencial. Nessas situações, meios complexos podem ser suficientes ou até mesmo vantajosos. Os **meios complexos** empregam componentes de produtos microbianos, animais ou vegetais, como a caseína (proteína do leite), carne (extrato de carne), soja (caldo trípico de soja), células de leveduras (extrato de levedura), ou várias outras substâncias altamente nutritivas. Esses produtos de digestão encontram-se disponíveis comercialmente na forma desidratada, e necessitam apenas de hidratação para originar um meio de cultura. Entretanto, a desvantagem no uso de um meio complexo consiste no fato de que a sua composição nutricional não é precisamente conhecida. Um *meio enriquecido*, utilizado na cultura de microrganismos nutricionalmente exigentes (fastidiosos), muitos dos quais são patógenos, começa como um meio complexo e, em seguida, é suplementado com substâncias adicionais altamente nutritivas como o soro ou sangue.

Em situações particulares, especialmente na microbiologia diagnóstica, frequentemente os meios de cultura são produzidos de modo a tornarem-se seletivos ou diferenciais (ou ambos). Um *meio seletivo* contém compostos que inibem seletivamente o crescimento de alguns microrganismos, mas não o de outros. Por exemplo, meios seletivos estão disponíveis para o isolamento de determinados patógenos, como

Tabela 3.2 Exemplos de meios de cultura para microrganismos com requerimentos nutricionais simples e exigentes^a

| Meio de cultura definido para <i>Escherichia coli</i> | Meio de cultura definido para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Meio de cultura complexo para <i>E. coli</i> ou <i>L. mesenteroides</i> | Meio de cultura definido para <i>Thiobacillus thioiparus</i> |
|---|---|---|--|
| K_2HPO_4 7 g KH_2PO_4 2 g $(NH_4)_2SO_4$ 1 g $MgSO_4$ 0,1 g $CaCl_2$ 0,02 g Glicose 4–10 g Elementos-traço (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 µg cada Água destilada 1.000 mL pH 7 | K_2HPO_4 0,6 g KH_2PO_4 0,6 g NH_4Cl 3 g $MgSO_4$ 0,1 g Glicose 25 g Acetato de sódio 25 g Aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) 100–200 µg cada Purinas e pirimidinas (adenina, guanina, uracila, xantina) 10 mg cada Vitaminas (biotina, folato, ácido nicotínico, piridoxal, piridoxamina, piridoxina, riboflavina, tiamina, pantotenato, ácido <i>p</i> -aminobenzoico) 0,01–1 mg cada Elementos-traço (como na primeira coluna) 2–10 µg cada Água destilada 1.000 mL pH 7 | Glicose 15 g Extrato de levedura 5 g Peptona 5 g KH_2PO_4 2 g Água destilada 1.000 mL pH 7 | KH_2PO_4 0,5 g NH_4Cl 0,5 g $MgSO_4$ 0,1 g $CaCl_2$ 0,05 g KCl 0,5 g $Na_2S_2O_3$ 2 g Elementos-traço (como na primeira coluna) Água destilada 1.000 mL pH 7 Fonte de carbono: CO_2 do ar |
|  | |  | |
| (a) | | (b) | |

^aAs fotos são tubos do (a) meio definido descrito e do (b) meio complexo descrito. Observe como o meio complexo é colorido devido aos vários extratos orgânicos e restos digestivos que ele contém. Créditos da foto: Cheryl L. Broadie e John Vercillo, Southern Illinois University em Carbondale.

linhagens de *Salmonella* ou *Escherichia coli* que causam intoxicação alimentar. Um meio diferencial corresponde àquele ao qual um indicador, normalmente um corante, é adicionado, revelando por meio de uma mudança de coloração se uma reação metabólica em particular ocorreu durante o crescimento. Os meios diferenciais são bastante úteis na distinção de espécies bacterianas, e são amplamente utilizados no diagnóstico clínico e na microbiologia sistemática. Os meios diferenciais e seletivos serão discutidos no Capítulo 27.

Necessidades nutricionais e capacidade biossintética

Das quatro fórmulas de meios de cultura apresentadas na Tabela 3.2, três são de meios definidos e um é complexo. O meio complexo é mais facilmente preparado e permite o crescimento de *Escherichia coli* e *Leuconostoc mesenteroides*, os exemplos utilizados na tabela. No entanto, o meio definido simples permite o crescimento de *E. coli*, mas não o de *L. mesenteroides*. O crescimento deste último organismo em um meio definido requer a adição de vários nutrientes não requeridos por *E. coli*. As necessidades nutricionais de *L. mesenteroides* podem ser supridas pela preparação de um meio definido altamente suplementado, um procedimento bastante trabalhoso devido aos vários nutrientes individuais que devem ser adicionados (Tabela 3.2), ou pela preparação de um meio complexo, um procedimento muito menos complicado.

O quarto meio apresentado na Tabela 3.2 suporta o crescimento da bactéria sulfurosa *Thiobacillus thioparus*; esse meio não suporta o crescimento de nenhum dos outros organismos. Isso se deve ao fato de que *T. thioparus* é um organismo quimiolitotrófico e autotrófico e, portanto, não necessita de carbono orgânico. *T. thioparus* deriva todo seu carbono a partir de CO_2 e obtém sua energia pela oxidação do composto sulfuroso tiosulfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Assim, *T. thioparus* exibe a maior capacidade biossintética entre todos os organismos listados na tabela, superando até mesmo *E. coli* nessa questão.

A lição que deve-se levar da Tabela 3.2 é que diferentes microrganismos podem exibir exigências nutricionais extremamente distintas. Para obter-se sucesso no cultivo de qualquer microrganismo, é necessário o conhecimento de suas necessidades nutricionais, a fim de que os nutrientes sejam fornecidos na forma e proporções adequadas.

Cultivo laboratorial

Uma vez que um meio de cultura tenha sido preparado e esterilizado, a fim de torná-lo desprovido de qualquer forma de vida, organismos podem ser inoculados, e a cultura incubada em condições que permitam o crescimento (Figura 3.2). Em um laboratório, normalmente a inoculação será de uma cultura pura em um meio de cultura líquido ou sólido. Os meios de cultura líquidos são solidificados com ágar, normalmente a 1 a 2%. Os meios sólidos imobilizam as células, permitindo que elas cresçam e originem massas isoladas e visíveis, denominadas colônias (Figura 3.2). As colônias bacterianas podem exibir várias formas e vários tamanhos, dependendo do organismo, das condições de cultivo, dos nutrientes fornecidos, além de vários outros parâmetros fisiológicos. Alguns microrganismos produzem pigmentos que tornam toda a colônia colorida (Figura 3.2). As colônias permitem ao microbiologista

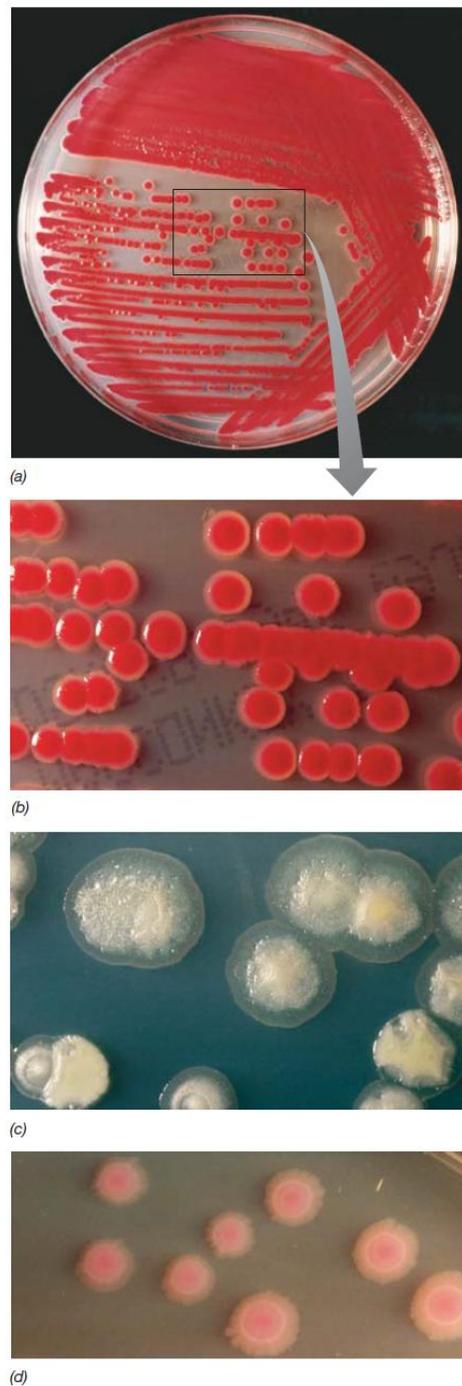


Figura 3.2 Colônias bacterianas. Colônias são massas visíveis de células originadas de sucessivas divisões de uma ou poucas células, podendo conter mais de um bilhão (10^9) de células individuais. (a) *Serratia marcescens*, cultivada em ágar MacConkey. (b) Ampliação das colônias apresentadas em (a). (c) *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em ágar tripticase soja. (d) *Shigella flexneri* cultivada em ágar MacConkey.

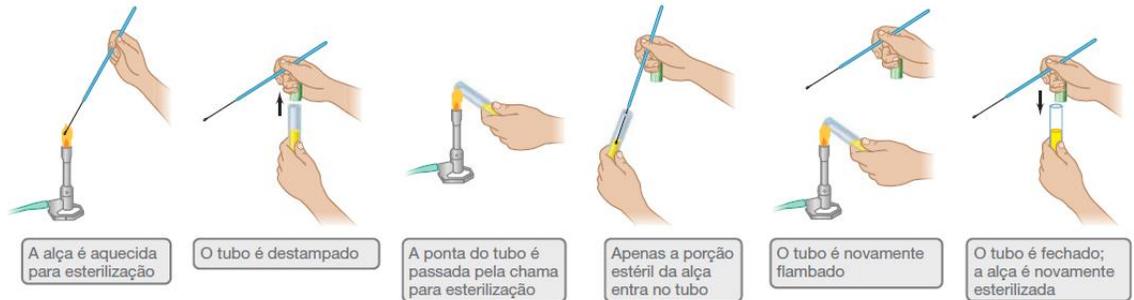


Figura 3.3 Transferência asséptica. Após o tubo ser vedado no final, a alça é novamente esterilizada antes de ser dispensada.

observar a composição e pureza presumida da cultura. Placas contendo mais de um tipo de colônia são indicativas de uma cultura contaminada.

Os meios de cultura precisam ser esterilizados antes do uso, e o processo de esterilização é obtido pelo aquecimento do meio em uma *autoclave*. Serão discutidos a operação e os princípios da autoclave na Seção 5.17, juntamente com outros métodos de esterilização. Uma vez que um meio de cultura estéril tenha sido preparado, o mesmo se encontra pronto para inoculação. Essa manipulação requer o emprego de uma **técnica asséptica** (Figuras 3.3 e 3.4), uma série de etapas que visam prevenir a contaminação durante a manipulação de culturas e de meios de cultura estéreis. O domínio da técnica asséptica é necessário para a manutenção de culturas puras, uma vez que os contaminantes transmitidos pelo ar estão presentes em todo lugar (Figuras 3.3 e 3.4). A coleta e nova semeadura de uma colônia isolada é o principal método para a obtenção de culturas puras, a partir de amostras líquidas contendo diferen-

tes organismos, e é um procedimento comum nos laboratórios de microbiologia. Outras técnicas para a obtenção de culturas puras foram desenvolvidas especialmente para grupos específicos de bactérias com necessidades nutricionais incomuns, e essas serão discutidas na Seção 18.2.

MINIQUESTIONÁRIO

- Por que um meio de cultura complexo para *Leuconostoc mesenteroides* seria mais facilmente preparado do que um meio quimicamente definido?
- Em qual meio apresentado na Tabela 3.2, definido ou complexo, você acredita que *E. coli* crescerá mais rapidamente? Por quê? *E. coli* não é capaz de crescer no meio descrito para *Thiobacillus thioparus*. Por quê?
- Qual o significado da palavra estéril? Por que a técnica asséptica é necessária para um cultivo bem-sucedido de culturas puras em laboratório?

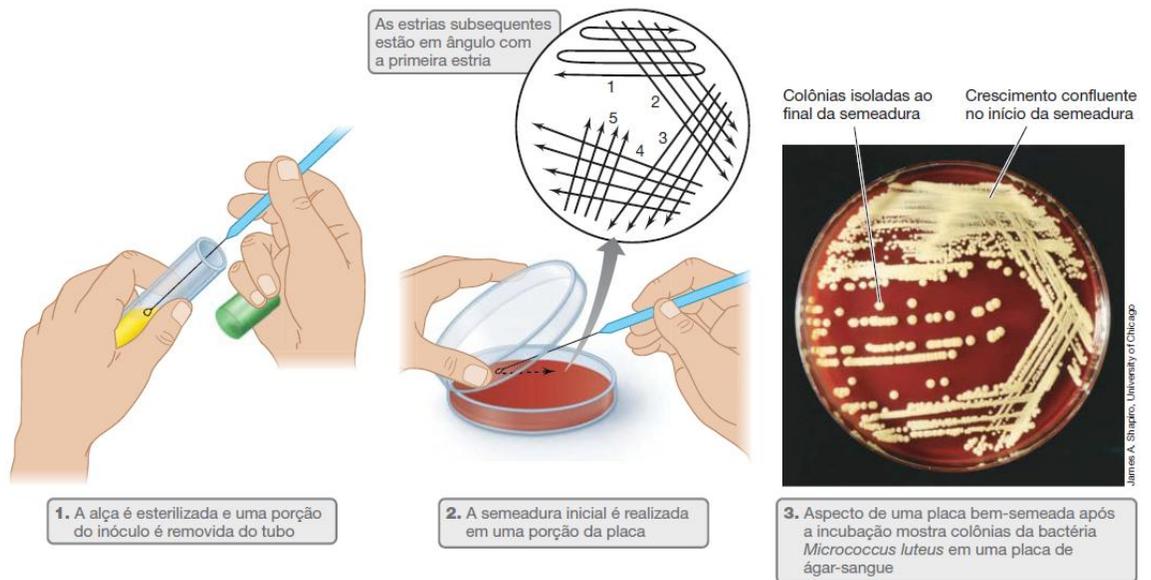


Figura 3.4 Técnica de semeadura por esgotamento, para a obtenção de culturas puras. A cobertura da placa deve ser aberta apenas o suficiente para permitir a manipulação para o estriamento.